

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-86974

⑤ Int. Cl.⁴

A 61 L 27/00
A 61 K 37/02

識別記号

ADT

庁内整理番号

G-6779-4C
8615-4C

⑬ 公開 昭和64年(1989)3月31日

審査請求 有 請求項の数 6 (全6頁)

⑭ 発明の名称 半月組織の治療用薬剤配合物及びインプラント

⑮ 特 願 昭63-150381

⑯ 出 願 昭63(1988)6月20日

優先権主張 ⑰ 1987年6月19日 ⑱ 米国(US) ⑲ 064215

⑳ 1988年6月8日 ㉑ 米国(US) ㉒ 204097

⑳ 発 明 者 バート・エル・バリー 米国マサチューセッツ州ケンブリッジ、ブラウン・ストリート56

㉑ 発 明 者 トマス・ヴィー・キング 米国マサチューセッツ州ウインチエスター、トウー・ボカホンクス・ドライブ(番地なし)

㉒ 出 願 人 プレジデント・アンド・フェローズ・オブ・ハーバード・コレッジ 米国02138マサチューセッツ州ケンブリッジ、クインシー・ストリート17

㉓ 代 理 人 弁理士 倉内 基弘 外1名

明 細 書

1 発明の名称 半月組織の治療用薬剤配合物及びインプラント

2 特許請求の範囲

(1) 破損軟骨治療のための脈管形成因子を含有する薬剤配合物。

(2) 前記脈管形成因子が下記式で表わされるポリペプチド:

<Glu-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-
Phe-Leu-Thr-Gln-His-Tyr-Asp-Ala-Lys-
-Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-
Cys-Glu-Ser-Ile-Met-Arg-Arg-Arg-Gly-
-Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Asp-Ile-
Asn-Thr-Phe-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-
-Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-
Lys-Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-
-Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser-Ser-Phe-
Gln-Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly

⁷⁰
-Gly-Ser-Pro-Trp-Pro-Pro-Cys-Gln-
Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-Asn-
¹⁰⁵
-Val-Val-Val-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly-
Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Gln-Ser-Ile-
¹²⁰
-Phe-Arg-Arg-Pro-OH
¹²⁵

或は該ポリペプチドと実質的に同じ脈管形成能を有する該ポリペプチドの軟骨形成部片または誘導体である前記第1項記載の配合物。

(3) 前記脈管形成因子を生理学上許容し得る該因子用キャリアーに植え付けた形である前記第1項または第2項記載の配合物。

(4) 脈管形成因子を固体ポリマーとアルブミンとのブレンドである固体キャリアー中に含む損傷後の半月の通常無血管組織の治療を促進するインプラント。

(5) 前記脈管形成因子が下記式のポリペプチド:
<Glu-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-Phe-
-Leu-Thr-Gln-His-Tyr-Asp-Ala-Lys-
Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-Cys-
-Glu-Ser-Ile-Met-Arg-Arg-Arg-Gly-

Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Asp-Ile-Asn⁴⁵
 -Thr-Phe-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-
 Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-Lys⁶⁰
 -Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-
 Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser-Ser-Phe-Gln⁷⁵
 -Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly-
 Gly-Ser-Pro-Trp-Trp-Pro-Pro-Cys-Gln⁹⁰
 -Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-
 Asn-Val-Val-Val-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly¹⁰⁵
 -Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Glu-Ser-
 Ile-Phe-Arg-Arg-Pro-OH^{120 123}

である特許請求の範囲第4項記載のインプラント。

(6) 前記ポリマーがエチレン-ビニルアセテートポリマーである特許請求の範囲第5項記載のインプラント。

3 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は損傷を与えられた通常無血管の組織の治癒を促進する薬剤配合物及びインプラントに関

62-B巻、397-402頁(1980年)は、切開したウサギの半月を切開を縫合して治癒することを立証し及び血管組織でなく、滑液細胞の侵入が治癒の前駆として始まり、大して血管のない癒痕となることを示した。アーノフスキー(Arnoesky)等、Am. J. Sports Med., 10(2)巻、90-95頁(1982年)は、血管がヒトのヒザの半月の周辺四分の一においてのみ見出されることを示し及び脈管供給があまりに乏しくて線維軟骨を裂傷した後の自発的治癒を促進する炎症性応答を支持することができないと結論した。

脈管形成因子は創傷治癒において重要な役割を果たすことが知られており(レッテュラ(Rettura)等、FASEBアブストラクト第4309号、61回アニュアルミーティング、シカゴ、(1977年))及び腫瘍細胞及び創傷液から(バンダ(Banda)等、Proc. Natl. Acad. Sci., アメリカ合衆国、79巻、7773-7777頁(1982年)、米田特許4503058号)及び網膜細胞から(ドアマール(D'Amore), Proc. Natl. Acad.

Sci., より詳細には脈管形成因子を損傷の近くに適用して治癒を促進するための薬剤配合物及びインプラントに関する。

従来の技術

通常無血管の組織、特にヒザ或は手根、肋骨の末端、或は関節下顎関節の半月(メニスカス)等の線維軟骨が、裂傷或は断傷等の創傷損傷の後に或は故意の外科切開の後に、血管新生された周辺を除いて、耐血管化及び治癒性であることは昔から知られている。キング、J. Bone Joint Surg., 18巻、333-342頁(1936年)は、裂傷させた犬の半月を、裂傷が関節と後面で通じるとすれば、組合組織によつて治癒され得ることを教示した。この教示内容はカボード(Cabard)等、Am. J. Sports Med., 9(3)巻、129-134頁(1981年)によつて引用された。後者は、犬及びモンキーの裂けた半月の治癒が周辺滑膜組織と接触する脈管癒痕組織を通して行なわれ及び裂傷の深部に伸びることを示した。ヒートリー(Heatley)、J. Bone Joint Surg.,

Sci., アメリカ合衆国、78巻、3068-3072頁(1981年)に引用された。フォークマン(Folkman)等、J. Exp. Med., 133巻、275-288頁(1971)はウォーカー(Walker)256ラット腹水腫瘍から腫瘍脈管形成因子を単離した。因子は毛管内皮細胞についてミトゲンであり及びR Naseによつて不活化された。ツアン(Tuan)等、バイオケミストリー、12巻、3159-3165頁(1973年)は、ウォーカー256腫瘍の非ヒストンタンパクにおいてミドゲン及び脈管形成活性を見出した。活性成分はタンパク質と炭水化物との混合物であつた。種々の動物及びヒトの腫瘍が脈管形成因子を産生することが示された(フィリップス及びクマー(Kumar), Int. J. Cancer, 23巻、82-88頁(1979年))が、因子の化学的性質は求められなかつた。ウォーカー256腫瘍からの低分子量非タンパク質成分もまた脈管形成性であり及びミドゲン性であることが示された(ワイズ(Weiss)等、Br. J. Cancer, 40巻、493-496頁

(1979年)、フエンセロー(Fonselau)等、*J. Biol. Chem.*, 256巻、9605-9611頁(1981年)は分子量400-800ダルトンを有する脈管形成因子を精製して均質にしたが、それ以上特性表示しなかつた。ヒトの肺腫瘍細胞は、高分子量キャリアー及び低分子量の、おそらく非タンパク質、活性成分から成る脈管形成因子を分泌することが示された(クマー等、*Int. J. Cancer*, 32巻、461-464頁(1983年))。バリー(Vallee)等、*Experientia*, 41巻、1-15頁(1985年)は、ウオーカー256腫瘍からの3つの留分に伴う脈管形成因子を見出した。トルバート(Tolbert)等、米国特許4,229,531号は、ヒト腺癌細胞系HT-29から脈管形成因子を生成することを開示した。ヘパリン-ビルディンググロースファクター、トランスホーミンググロースファクターアルファ、トランスホーミンググロースファクターベータもまた知られている脈管形成因子である。アンギオゲニンとして知られている脈管形成タンパク質がヒト癌細胞から単

及びその脈管形成性断片或は部分或は1~数個のアミノ酸を削除或は置換させ、上に挙げた式のペプチドと実質的に同じ脈管形成活性を維持するそのペプチド誘導体が本発明を実施するために選んでいる。記号>Gluはピログルタミン酸部分を表わすのに用いる。

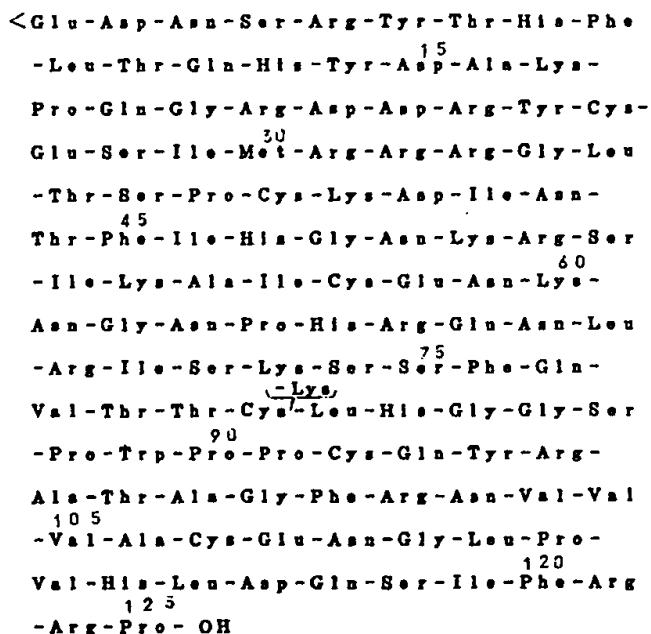
遺伝子工学分野における当業者ならば、遺伝子工学技法によつて簡便に作ることができる上記のペプチド構造に関連した種々のペプチドを認めるものと思う。それらのペプチドは、リーダーセグメント、例えば満足される(met)開始コドンによつてコードされたセグメント等、を有することができる。こうして、上記の構造に均等な広範囲のペプチドが、慣用の遺伝子工学技法によつて容易に入手し得る。

問題点を解決するための手段

今、有効投与量の脈管形成因子を損傷された組織の近辺に与えることを含む、裂傷、断傷或は切開等の損傷或は断続した後の半月の通常無血管の組織の治癒を促進する薬剤配合物を見出した。最

良の結果を得るためには、脈管形成因子を、例えば、脈管形成因子及び製薬上容認され得る非毒性キャリアーを含む組成物の形で、損傷部位の近くに或は直ぐ隣りに、好ましくは損傷された組織に直接接触させて適用或は移植する。キャリアーは液体であつても或は固体であつてもよく、及び例えばポリマー、例えばメチルセルロース或はエチレンとビニルアセテートとのコポリマー、或は脈管形成因子を長い時間にわたつてゆつくり放出する他のポリマー組成物にすることができる。後者の場合、脈管形成因子は時限放出インプラントの形である。本発明は上述した半月のような断続軟骨に特別の応用を有する。

すなわち、下記式のペプチド：



良の結果を得るためには、脈管形成因子を、例えば、脈管形成因子及び製薬上容認され得る非毒性キャリアーを含む組成物の形で、損傷部位の近くに或は直ぐ隣りに、好ましくは損傷された組織に直接接触させて適用或は移植する。キャリアーは液体であつても或は固体であつてもよく、及び例えばポリマー、例えばメチルセルロース或はエチレンとビニルアセテートとのコポリマー、或は脈管形成因子を長い時間にわたつてゆつくり放出する他のポリマー組成物にすることができる。後者の場合、脈管形成因子は時限放出インプラントの形である。本発明は上述した半月のような断続軟骨に特別の応用を有する。

有効な用途について要求される投与量は使用する脈管形成因子の強さ及び純度に応じて広範囲にわたつて変わる。純アンギオゲニン(angiotensin)の場合、メチルセルロースのような急速に放出させるようなキャリアーで投与する場合、投与量は治癒すべき傷の長さ2-4cm当り500-900ngの範囲になり得る。特定の場

な投与量の最適なサイズは日常の試験によつて決めることができる。本薬剤配合物は治療を通常6~10週内で完治するので、およそ同じ期間、すなわち、6~10週間伸ばして尿管形成因子の供給を与える時解放インプラントを用いるのがよい。

半月の無血管中央部分における損傷に直接して移植或は投与する際の尿管形成因子は新尿管形成(neovascularization)、次いで損傷を、縫合を使用しないでさえ、治療することを含む。

右側下方肢全体の毛をそり、70%のアルコール溶液で健え及び消毒したタオルで包んだ。ひざ関節を、外側パラパテラースキャン及び支持切開して暴露した。小板の中央を脱臼させ、腓骨髄のオリジンを分割し、ひざを曲げた。10x8mmを用いた双脱解創用鋼板製器下で、ミクロスキャンフックを半月の前のホーンに入れた。半月を前方に引き及び外側半月の前方三分の一を目視した。小さいメスを用いて半月縁から2mmで出発して半月の本体におよそ0.8mm×2.5mmの水平ポケットを穿いた。ポケットを後に半月体の中央三分の一内の頂部組織の可視表面下で伸ばした。滑膜への損傷を最小にするように注意を払った。

メチルセルローズ(4000CP)をオートクレーブに入れ、次いで滅菌水中4℃で一晩攪拌して溶解した(1% w/v)。アンジオゲニンの凍結乾燥した塩の存在しない原料を1%のメチルセルローズ中4℃で2時間穏やかに攪拌して懸濁させた。10ミクロリットル容量を清潔な、乾燥した

下記の特定制は、発明を例示するつもりであつて、発明の範囲を制限するつもりのもではない。

個々のケージに入れた各々が重さ5~7kgの97匹の雄のニュージールランド白色ウサギに標準の食餌を与えたが、手術の前後の両方で、テトラサイクリンを予防として飲み水に加えた。

アセプロマジン(Acepromazine)マレエート(カンザス、エルウッド、Teeb America Group, Inc.: 2-アセチル-10-(3-ジメチルアミノ-プロピル)フェノチアジンヒドロクエンマレエート)、15mg/体重1kg及びケタミン(ニューヨーク、シラキュース、Bristol Laboratories: DL-2-(6-クロロフェニル)-2-(メチルアミノ)シクロヘキサノンヒドロクロリド)、25mg/体重1kgの筋肉内注射及び1%のキシロカイン(マサチューセッツ、ウエストボロー、Astra Pharmaceutical Products, Inc.: アセトアミド、2-(ジエチルアミノ)-N-(2,6-ジメチルフェニル)-モノヒドロクロリド)2ccの局部皮下注射を用いて、ウサギに麻酔した。

したマイラーシートの上にのせ、腐敗条件下で風乾して直径3mmの透明なペレット或はディスクを形成した。各々はアンジオゲニン100ngを収容した。ペレットを収容するシートを滅菌した正方形ペレット皿に入れ、デシケーター中に入れ、更に60分間凍結乾燥して、ペレットが完全に乾燥するのを確実にした。アンジオゲニンを含有しない対照のメチルセルローズディスクを調製した。ディスクを、滅菌条件下で、個々に鉗子でプラスチックシートから取り出し、折りたたみ、各々を別々に20ゲージ針の鋭い端部に差し込んだ。

試料を保持する20ゲージの針の尖端を各ラビットの半月のポケットに挿入し、20ゲージのとけ杖(spinal)針からの栓を用いて針から円板を外し、試料を正確に取出し及び半月組織中へ押し込んだ。次いで、1mmの垂直切断(ナイフカット)をポケットの中間に作つて縦の裂傷をシミュレートした。

縫合を回復し、組織を500mgゲンタミシン/1gを含有する0.9%食塩水で洗浄した。該装置

帯を3-0ビクリル(Vicryl) 吸収性縫合を間欠的に8箇所行つて閉じ、4-0ビクリル皮下連続縫合で皮ふを閉鎖した。ラビットをケージ内に放し、標準の餌を与えた。ナトラサイクリンを術後・術後に飲料水に加えた。

ラビットの群を、アセプロマジンマレエート50mg/kg及びケタミン50mg/kgの致死の静脈注射を用いて、3、6、8、9、12及び26週の間隔で殺した。臓器を解剖顕微鏡を用いて全体的に検査し、所見を記録した。観察者には移植した資料の識別をブラインドにした。結果を新脈管形成の有無により評価した。それらの試料については、ポケット及び切断の有無(治療・非治療)に関して第2の観察を記録した。

組織学的検査についての試料を10%中性緩衝ホルマリン溶液中に貯蔵した。半月とその下の骨を通る横断切片を脱灰し、ヘマトキシリン及びエオシンで包埋し及び染色させ、光学顕微鏡検査した。

アンジオゲニンを移植した75個の半月のうち、

前角の上に成長し、それがポケット及び切断部へ向つていた。隆起血管は見られず、連結組織はポケットまたは切断部に達していなかった。しかし、これらの結果は有効例として評価される。

アンジオゲニン群と対照群との統計上の差は有意であつた。

アンジオゲニン群では、新脈管形成は4週間前に殺したもののうち27% (8個中3個)に見られ、6~10週のものでは57% (53個中30)に見られ、また10週後のものは43% (14個中6個)に見られた。治療時間の分析を表1に示す。

対照群において、2つの「ポジティブな」応答が6週及び8週に見られた。

39 (52%)に新脈管形成が観察された。新脈管形成は前角及び半月の本体に接する前膜から移植ポケット方向に成長する、隆起血管との結合組織のパンヌス(血管増殖)と特徴付けられる。ポケット口と切断部の閉鎖(「治療」)はこれら39個の新脈管形成半月中、8個で起きた。「治療」はポケットを縫い、且つ口を縫うに充分な強さの結合組織のパンヌス形成に付随するものと思われる。半月の前角の狭窄は、「癒着組織」のある程度の治療拘縮が起きていたかの如くこの強い反応に伴うことがしばしばあつた。

新脈管形成のないアンジオゲニン群は、明らかに術後変化がなく、移植日と同じに見え、血管形成はパンヌスが見られなかった。ポケットと切断部は変わらず、メチルセルロースは見出されなかった。

対照群では、22個中20 (91%)の肢は手術日の状態のままで、新脈管形成もなく、ポケットまたは切断部(ナイフカット)の変化もなかった。2個の肢(9%)では結合組織のパンヌスが

表 1

アンジオゲニン移植及び取捨する経過時間

経過時間 (週)	ラビット数	ポジティブの結果数
3	8	3 (27%)
6	14	5 (35%)
8	23	12 (52%)
9	16	13 (81%)
12	8	4 (50%)
26	6	2 (33%)

ヘマトキシリン及びエオシンで染色した組織片は、移植脈管に侵入する強い、周囲から半月^{移植}組織組織により取囲まれた広い脈管を示した。隆起管を有する前膜組織は半月の表面に付着していた。加えて、新たな軟骨組織であると思われるものによる異常な組織映像は侵入組織と正常組織軟骨との界面において観察された。

エチレン：ビニルアセテートコポリマー(60:40)をラビットアルブミンと共にアンジオゲニン用キャリアーとして用いて同じ結果を得た。

エルバックス (Elvax) 球のラビットアルブミン含 量の最適化

加入したアンギオゲニンを放出するコポリマー
対アルブミンの最適な比を求めるために、ラビッ
トアルブミン及びコポリマー（エルバックス 40
P）を種々の量で加入した一連のペレットを作つ
た。ラビット血清アルブミン 50 ㎎ 及び所望の量
の 125 I 標識したアンギオゲニンを水 1 ㎖ 中に溶
解し及び 0.22 ミクロンフィルターに通して通過
して滅菌チューブに入れて滅菌した。滅菌溶液を
次いで凍結し及び凍結乾燥した。ラビットアルブ
ミンはパルタキャリヤー及びアンギオゲニン放出
のエフェクターとして働き、ラビット由来である
のでラビットに移植した後に何ら免疫反応を何ら
生じない。凍結乾燥したアルブミン-アンギオゲ
ニン固体を滅菌した状態で混合して均質な粉末と
した。粒径の均一性は製剤の有効性にとって重要
である。次いで、コポリマーをジクロロメタンに
溶解した 10 重量部 1 ㎖（コポリマー 100 ㎎）
を、所望の量の粉末を収容するチューブに加え、

0 及び 10 重量部を含有するペレットは 1 日にア
ンギオゲニンを少ない量で放出し、その後放出し
なかつた。おそらく、放出された物質はペレット
の表面上にあつたものと思われる。アルブミン
4.0 及び 5.0 重量部を含有するペレットは 1 日にア
ンギオゲニンを大きい量で放出し（それぞれ 58
% 及び 77 %）、アルブミン 50 量のペレットは
中位の放出速度を示したにすぎない。このデータ
から、コポリマー 2 重量部及びラビットアルブミ
ン 1 重量部から成る実用的組成物を用いて 1 ペレ
ット当りアンギオゲニン 10 ナノグラム～10 マ
イクログラムを含有するペレットを作つた。

かかるペレットの有効性は、半月ポケットにか
けるインプラントとしてメチルセルロースペレ
ットの代りにコポリマー：アルブミン 2：1 のペレ
ットから切出したピラミッド形状の片を用いて本
質的に上述した外科的手法に従つて試験した。ア
ンギオゲニン全 100 ㎍ を含有する 1 個は 2
個の片を鉗子を用いて各々のポケットの中に入れ
た。対照はアンギオゲニンを含有しなかつた。代

チューブをシールし、内容物を滅菌ミキサー上で
高速攪拌において 10 分までの間攪拌して均一な懸
濁液とした。この懸濁液を、18 ゲージスチール
針を付けた 5 ㎖ の使い捨て注射器の中に引き上げ
た。次いで、懸濁液を、無水 (absolute) エタノ
ール 20 ㎖ をドライアイス/エタノール浴中で -
78℃ に冷却した 50 ㎖ ビーカーに落とすことによ
る針筒の中に押出した。滴は冷エタノールと接
触した際にゲル化して球形状となつてビーカーの
底に沈んだ。10 分後にビーカーを冷浴から取り
出し及び暖めさせて室温にした。ジクロロメタン
をゆつくりエタノールに抜き取るにつれてビーズ
は白色に変わつた。新しいエタノール溶液中で一
晩インキュベートした後ペレットを細流フード
中で風乾した。このようにして作つたペレット
（数から 50）は寸法約 1 ㎜² であつた。これ
らのペレットからのアンギオゲニンの放出速度は、
ペレットを 37℃ の生理的食塩水中にインキュベ
ートすることによつて測定し及び 125 I アンギオ
ゲニンの時間による放出を測定した。アルブミン

表的には、P-5 針に単一の 4/0 ビクリル或は
6/0 プロリン縫合糸をつけて用いてポケットを
閉じた。動物を 8 週で捕獲し及び半月の治療及び
新臓器形成を検査した。

結果を下記の表 2 に示す：

	表 2 ラビットの数			ポジティブ 効果を示す パーセンテ ージ
	治療した	新臓器形成	効果無し	
アンギオゲニン	21	21	45	48
対 照	2	0	10	10

アルブミンと他のポリマーとのブレンド或は混
合物もまた時間放出インプラントにおけるアンギ
オゲニン用キャリヤーとして用いてよい。各々の
場合において最適な有効性についての割合は簡単
な試験によつて求めることができる。

代理人の氏名 新 内 恭 弘

同 風 間 弘 志